

**URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ**



**PCT/PL2005/00022**

**ZASWIADCZENIE**

**Fundacja Rozwoju Diagnostyki i Terapii**

**Warszawa, Polska**

złożyła w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej dnia 29 marca 2004 r. podanie o udzielenie patentu na wynalazek pt. „**Nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz sposób ich otrzymywania.**”

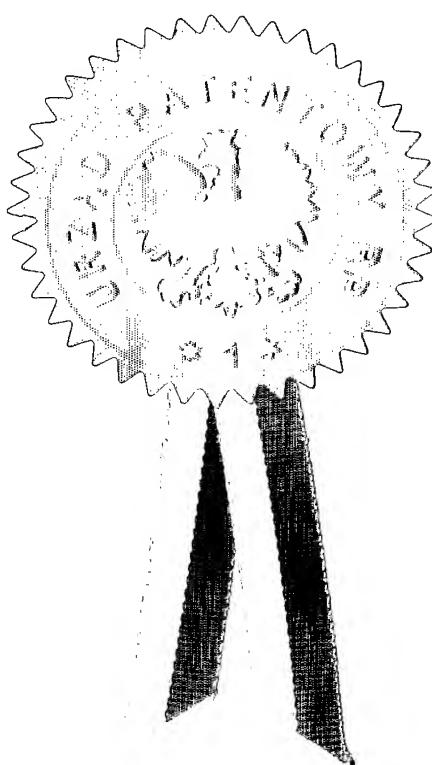
Dołączone do niniejszego zaświadczenie opis wynalazku, zastrzeżenia patentowe są wierną kopią dokumentów złożonych przy podaniu w dniu 29 marca 2004 r.

Podanie złożono za numerem **P-366690.**

Warszawa, dnia 17 czerwca 2005 r.

z upoważnienia Prezesa

mgr inż. Monika Więckowska  
Dyrektor Departamentu



## Nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz sposób ich otrzymywania

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz sposób ich otrzymywania.

Ze stanu techniki znany jest niepodstawniony 2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol znaleziony w owocach jako produkt degradacji środka przeciwbakteryjnego Benomylu (Pease i Gardiner, 1969). Jego strukturę zaproponowana na podstawie widma masowego, jednak jego synteza nie została dotychczas opisana.

Z opisu patentowego nr US 2003/0027842A1 znany jest 2-hydroksy 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol otrzymany w reakcji bromowania 3-karboksy-4,6,7-tribromo-2-hydroksybenzimidazolu oraz 1-alkilo-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole otrzymywane poprzez alkilowanie halogenkiem 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu w środowisku zasadowym.

Halogenopochodne benzimidazolu wykazują wiele interesujących właściwości biologicznych. Wiadomo jest, że pochodne 2-trifluorobenzimidazolu jak i niektóre pochodne bromobenzimidazoli posiadają wysoką aktywność przeciwpiwotniakową, przeciwbakteryjną i przeciwirusową (Navarete-Vazquez et al. Bioorg.Med.Chem.Lett.11, (2001), 187-191; Andrzejewska et al. Eur.J.Med.Chem. 37 (2002), 972-978)<sup>2</sup>. Najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie szczególnej aktywności biologicznej halogenopochodnych benzimidazolu to posiadanie przez nie zdolności zakłócania metabolizmu komórki poprzez inhibicję enzymów regulujących metabolizm kinaz białkowych.

Kinazy białkowe są dużą grupą enzymów (ponad 500 rodzajów kodowanych przez ludzki genom) obecnych w każdej komórce eukariotycznej i proeukariotycznej spełniających szczególną rolę regulatorów mechanizmów komórkowych. Enzymy te katalizują przeniesienie grupy fosforanowej z ATP ewentualnie GTP na aminokwasy serynę, treoninę lub tyrozynę. Są to

generalnie „spokojne” enzymy, uaktywniają się jednak na poszczególnych etapach, w tym także patologicznych, metabolizmu komórki. Obecnie kinazy białkowe, a szczególnie ich inhibitory, cieszą się dużym zainteresowaniem jako potencjalne obiekty pomocne w projektowaniu specyficznych leków. Owocem badań nad inhibitorami kinaz jest przykładowo Gleevec, lek przeciwko chronicznej białaczce szpikowej (Druker i inni. 2001)<sup>3</sup>.

Szczególną rodziną kinaz białkowych są tzw. kinazy kazeinowe (CK1 i CK2), dla których istnieje ponad trzysta białek będących substratami dla tych enzymów. Uczestniczą one w wielu procesach komórkowych (Litchfield, 2003)<sup>4</sup>. Zebrano wiele dowodów, że ich podjednostki mogą zachowywać się jako onkogeny (Kelliher i inni, 1996, Orlandini i inni, 1998)<sup>5,6,7</sup>. Najbardziej znanym i silnym inhibitorem kinazy kazeinowej 2 (CK2) jest 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB)(Sarno i inni, 2001).

#### Badania farmakologiczne:

Badano efekt cytotoksyczny 4,5,6,7-tetrabromo-2-dimetyloaminobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat T.

1. Komórki białaczki typu Jurkat inkubowano 24 godziny w medium o wzrastającym stężeniu 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (TBB) lub 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (K25). Efekt cytotoksyczny oznaczano używając metody barwienia MTT ( bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenylotiazolowy). Jako kontrolę prowadzono inkubację komórek w medium z dodatkiem rozpuszczalnika (DMSO, 05% v/v). Wartości przedstawiono jako średnią z trzech eksperymentów. Otrzymany efekt cytotoksyczny 4,5,6,7-tetrabromo-2-dimetyloaminobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat T przedstawiono na Fig.1. Otrzymane wyniki potwierdzają, że 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol jest kilkukrotnie bardziej aktywny niż tetrabromobenzotriazol - znany inhibitor kinazy kazeinowej 2.

2. Komórki białaczki typu Jurkat inkubowano 14 godzin bez dodatku 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (C), oraz w medium o stężeniu 5 lub 10 uM 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz 50 ng/ml antiFas (aF), substancji kontrolnej do śledzenia procesu apoptozy. Aktywację kaspazy-białka enzymatycznego kontrolującego apoptozę stwierdzono obserwując degradację dwóch białek będących substratami tego enzymu HS1 i PARP. Efekt przedstawiono na Fig 2. Otrzymane wyniki wskazują, że molekularny mechanizm działania 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu może być wyjaśniony poprzez indukcję apoptozy-programowanej śmierci komórek.

Testy aktywności enzymatycznej kinaz przeprowadzono według metodyki opisanej przez Sarno i inni 2003. i zapisano w tabeli 1. Szczątkowa aktywność była określona poprzez inkubację w obecności inhibitora o stężeniu 10 $\mu$ M i wyrażona jako procent aktywności bez inhibitora.

Tabela 1. Testy aktywności enzymatycznej kinaz.

lp	Kinaza*	4,5,6,7-tetrabromo-benzotriazol (TBB)	2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (K25)
1.	CK1	91	87
2.	CK2	13	4
3.	G-CK	95	92
4.	DYRK1a	22	2

\*CK1 – kinaza kazeinowa 1, CK2 – kinaza kazeinowa 2, G-CK- kinaza kazeinowa z aparatu Golgiego, DYRK1a – (Dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase) Kinaza tyrozynowa o właściwościach regulacyjnych.

Dane eksperimentalne:

Natywna CK1 (nCK1) i CK2 (nCK2) została oczyszczona z wątroby szczura (Meggio i wsp., 1981); CK aparatu Golgiego (G-CK), oczyszczona z wydzielającego mleko gruczołu sutkowego szczura, była dostarczona przez Dr A.N. Brunati (Padwa, Włochy). Biało kinaz tyrozynowych Lyn, c-Fgr, Syk (również określana TPK-IIB) były oczyszczone ze śledziony szczura, jak poprzednio w odnośniku literaturowym (Sarno i wsp., 2003). Rekombinowane podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  ludzkiej CK2 były produkowane w E. coli a holoenzym był rekonstytuowany i oczyszczony jak opisano poprzednio (Sarno i wsp. 1996). Mutanty CK2: V66A i I174A uzyskano jak to opisano uprzednio (Sarno i wsp. 2003). Podwójny mutant V66AI174A otrzymano przy użyciu zestawu: "QuickChange-SiteDirected Mutagenesis" (Stratagene), stosując ludzki V66A  $\alpha$  cDNA włączony w wektor pT7-7 jako matryca i dwa syntetyczne oligonukleotydowe primery, 5'-GCACAGAAAGCTACGACTAGCAGACTGGGGTTGGC-3' i 5'-GCCAAACCCAGTCTGCTAGTCGA-CTTCTGTGC-3', każdy komplementarny do przeciwnieległych łańcuchów matrycy. Ekspresja i oczyszczanie mutanta przeprowadzono jak opisano poprzednio (Sarno i wsp., 2003). *Saccharomyces cerevisiae* piD261 był dostarczony przez Dr S. Facchin (Padwa, Włochy). Źródło wszystkich innych kinaz białkowych użytych w oznaczeniach specyficzności jest albo opisane albo posiada odnośnik literaturowy podany przez Daviesa i wsp. (2000).

Oznaczenia kinetyki:

Szybkości początkowe były oznaczane przy każdym z badanych stężeń substratu. Wartości Km były obliczane albo w nieobecności albo w obecności zwiększających się stężeń inhibitora z

wykresów podwójnej odwrotności Lineweavera-Burke'a. Stałe inhibitorowe były obliczane poprzez analizę regresji liniowej wykresów  $Km/V_{max}$  versus stężenie inhibitora. Biorąc pod uwagę, że wszystkie pochodne TBI zachowują się jak inhibitory kompetencyjne względem ATP, stałe inhibicji były również wyprowadzane z zależności  $IC_{50}/K_i$  Chenga-Prusoffa (Cheng i Prusoff, 1973) przez oznaczenie  $IC_{50}$  dla każdego związku przy  $1 \mu M$  stężeniu ATP.

#### Testy fosforylacji kinazy kazeinowej 2 (CK2):

Testy fosforylacji prowadzone były w obecności wzrastającego stężenia każdego inhibitora w próbce o objętości końcowej  $25 \mu l$  zawierającej  $50 \text{ mM}$  bufor Tris-HCl o pH 7.5,  $100 \text{ mM}$  NaCl,  $12 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub>,  $100 \mu M$  syntetycznego peptydu RRRADDSDDDD będącego substratem fosforylacji i  $0.02 \mu M$   $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP. Inkubację prowadzono przez 10 min w temperaturze  $37^\circ C$ . Reakcję zatrzymywano przez dodanie  $5 \mu l$   $0.5 \text{ M}$  kwasu ortofosforowego. Mieszankę inkubacyjną przenoszono na filtr z fosfocelulozy, który przemywano cztery razy  $75 \text{ mM}$  kwasem ortofosforowym ( $5-10 \text{ ml}$ ), następnie metanolem i suszono przed zliczeniem impulsów w liczniku scyntylacyjnym.

#### Test przeżywalności:

Komórki ludzkiej białaczki typu Jurkat T były hodowane w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% (v/v) albuminy cielęcej,  $2 \text{ mM}$  L-glutaminy,  $100 \text{ jednostek/ml}$  penicyliny i  $100 \mu g/ml$  streptomycyny. Do testu komórki ( $10^6/\text{ml}$ ) były zawieszone w medium zawierającym 1% (v/v) albuminy cielęcej, następnie inkubowane w  $37^\circ C$  w obecności różnych stężeń inhibitora. Komórki w teście kontrolnym były traktowane taką ilością rozpuszczalnika, w jakiej rozpuszczono inhibitor. Inkubacje przerwano przez dodanie buforu hipoosmotycznego jak to opisał Sarno i inni (2003). Przeżywalność komórek określono używając barwnika MTT (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenylotiazolowego). Aktywację kaspazy obrazowano techniką Western-blot monitorując degradację białek PARP i HS1 jak to opisał Ruzzene i inni (2002).

Dane eksperymentalne otrzymane jako wynik tej pracy nieoczekiwanie wskazują, że będące przedmiotem wynalezku otrzymane nowe związki, zachowując czterobromowany fragment benzenowy, który dobrze dopasowuje się do zagłębiania hydrofobowego w pobliżu miejsca wiążącego ATP modyfikując triazolowy fragment cząsteczki, posiadają znacznie lepsze właściwości w stosunku do znanego 4,5,6,7-tetrabromobenzotiazolu (TBB) jednego z najbardziej efektywnych i selektywnych inhibitorów kinazy kazeinowej 2.

Stwierdzono, że zastąpienie atomu azotu w pozycji 2 przez atom węgla pozwala na łatwiejsze dalsze modyfikacje w tej pozycji poprzez zastąpienie atomu wodoru w pozycji 2 grupami hydrofilowymi, co z

kolej umożliwia powstawanie nowych oddziaływań typu van der Waalsa, lub tworzenie wiązań wodorowych z polarnymi łańcuchami kinazy.

Najbardziej efektywny pośród zsyntetyzowanych inhibitorów, pochodnych benzimidazolu okazał się 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (K25), dla którego stała inhibicji (40nM) jest najniższą z dotychczas zaobserwowanych dla inhibitorów CK2. Jest ona o jeden rząd wielkości mniejszą niż dla TBB. Na podkreślenie zasługuje selektywność K25, porównywalna z TBB, gdyż tylko jedna kinaza, mianowicie DYRK1a spośród badanych ponad 30 kinaz wykazuje podobną podatność na inhibicję przez K25. Jednakże bardziej istotna jest kilkukrotnie wyższa cytotoxiczność K25 w porównaniu z TBB w stosunku do komórek białaczki typu Jurkat. K25 w odróżnieniu do TBB nie powoduje depolaryzacji izolowanych mitochondriów. Wszystko to wskazuje bezwzględnie, że K25 ma większe zalety niż TBB zwłaszcza do badań *in vivo*.

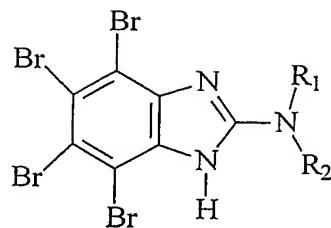
Stwierdziliśmy eksperymentalnie, że niektóre podstawione na grupie aminowej 2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole, są silniejszymi inhibitorami CK2 niż TBB, wyniki zestawiono w Tabeli 2. Tym samym wspomniane podstawione na grupie aminowej 2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole mogą być użyteczne jako potencjalne leki jak również odczynniki do badań w biologii molekularnej.

Tabela 2. Efektywność pochodnych 2-amino-4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu jako inhibitorów CK2.

L.p.	Związek	Stała inhibicji $K_i$ ( $\mu M$ )
1.	4,5,6,7-tetrabromobenzotiazol (TBB)	0.30
2.	2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.09
3.	2-metyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.09
4.	2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (K25)	0.04
5.	2-etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.13
6.	2-izopropylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.06
7.	2-(2-hydroksy)propyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.14
8.	2-dimetyloaminoetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.16

W związku ze znanym stanem wiedzy wskazującym na dużą ekspresję kinazy kazeinowej w mózgu chorych obciążonych syndromem Downa jak również w przypadku choroby Alzheimera, w których to chorobach występuje nadprodukcja kinazy DYRK1a, wydaje się bardzo prawdopodobną możliwość zastosowania nowych związków wg wynalazku do leczenia wymienionych chorób.

Podstawowym aspektem wynalazku są nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1

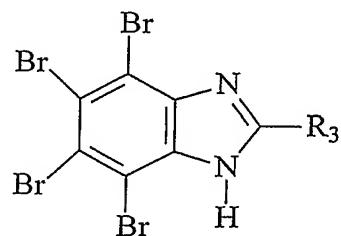


w którym R<sub>1</sub> oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R<sub>2</sub> oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa.

Nowymi pochodnymi są w przypadku niniejszego wynalazku następujące związki:

- 2-metyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-izopropyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-(2-hydroksypropylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-(2-dimetyloaminoetylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol.

Dodatkowym aspektem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych pochodnych 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1, w którym R<sub>1</sub> oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R<sub>2</sub> oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa, w reakcji związku o wzorze 2,



w którym podstawnik R<sub>3</sub> oznacza atom fluorowca, grupę alkilotiolową lub alkoksylową lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu, z aminą, w podwyższonej temperaturze, a następnie otrzymany produkt oddaje się oczyszczaniu przez krystalizację lub chromatografię na żelu krzemionkowym po czym ewentualnie działaniem kwasu nieorganicznego lub organicznego przeprowadza się w sól. Sposobem według wynalazku w związku o wzorze 2 podstawnik R<sub>3</sub> oznacza atom fluorowca taki jak Cl lub Br lub grupę alkilotiolową taką jak CH<sub>3</sub>S, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S,

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ , lub niższy alkoksyl taki jak grupa  $\text{CH}_3\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$  lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu taką jak grupa sulfonowa lub grupa alkilosulfotlenkowa.

Jako amina stosowana jest niższa alifatyczna amina pierwszorzędowa ewentualnie zawierająca w łańcuchu alifatycznym dodatkowo grupy hydroksylowe lub podstawione grupy aminowe. Jako amina może tyć także używana niższa alifatyczna amina drugorzędowa. Znamienne i korzystne dla sposobu według wynalazku jest, że amina stosowana jest jako reagent i rozpuszczalnik, w roztworze wodnym lub alkoholowym a reakcję związku o wzorze 2 z aminą prowadzi się w zakresie temperatur od 80 do 140 °C.

Otrzymane związki o wzorze 1 mogą zostać przekształcone w znany sposób w sole kwasów nieorganicznych lub organicznych.

Kolejnym aspektem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o działaniu przeciwnowotworowym, zawierająca efektywnie przeciwnowotworowo działającą ilość nowego związku wg wynalazku w kombinacji z co najmniej jednym obojętnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem, rozcieńczalnikiem lub zaróbką.

Związki według niniejszego wynalazku mogą być wytwarzane i podawane w bardzo różnych postaciach dawek do podawania doustnego i pozajelitowego. I tak związki według wynalazku, mogą być podawane na drodze iniekcji to jest dożylnie, domięśniowo, śródskórnie, podskórnie, wewnętrzdwunastniczo, wewnętrzotrzewnowo. W przeznaczeniu do podawania drogą pozajelitową wytwarza się postacie dawek jednostkowych w formie płynnej z udziałem każdego ze związków według wynalazku, a przykładowo 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolu i jałowego wehiculum, przy czym korzystnie stosuje się wodę. Wymienione związki, w zależności od rodzaju farmaceutycznie zgodnego nośnika mogą być zawieszone, albo rozpuszczone w wehikulum. Przy sporządzaniu roztworu, związek aktywny można rozpuścić w wodzie do wstrzykiwań i wyjąłować przez sączenie. Tak otrzymanym jałowym roztworem napełnia się fiołki lub ampułki, które następnie szczelnie się zamyka. Preparat po wypełnieniu nim fiołki można również zamrozić i usunąć wodę w warunkach próżni. Następnie suchy liofilizowany proszek zamyka się szczelnie we fiołce, do której dochodzi się drugą fiołką zawierającą wodę do wstrzykiwań, w celu przygotowania roztworu do wstrzykiwań. Związki te mogą być również podawane inhalacyjnie lub przezskórnie. Jest oczywistym dla specjalistów, że przedstawione formy dawkowania mogą zawierać jako składnik aktywny, zarówno nowe związki jak i farmaceutycznie dopuszczalną sól każdego ze związków wg wynalazku. Farmaceutycznie dopuszczalne nośniki, stosowane do wytwarzania kompozycji farmaceutycznych mogą być cieczą lub ciałem stałym. Preparaty w postaci ciała stałego obejmują proszki, tabletki, pigułki, kapsułki oraz dyspergowane granulki. Nośnikiem w postaci ciała stałego może być jedna lub

kilka substancji, które mogą działać jako rozcierczalniki, rozpuszczalniki, środki wiążące, konserwujące, dezintegrujące lub materiał kapsułkujący.

Kolejnym aspektem wynalazku jest zastosowanie nowych pochodnych wg wynalazku do wytwarzania leku o działaniu przeciwnowotworowym.

Aspektem wynalazku jest także sposób hamowania aktywności kinezy kazeinowej 2 u pacjentów wymagających takiego leczenia przez podawanie skutecznej ilości nowych pochodnych wg wynalazku

Obecny wynalazek będzie łatwiejszy do zrozumienia na postawie konkretnych przykładów, które uzupełnione zostały załączonymi rysunkami (Fig) i które mają na celu zilustrowanie wynalazku a nie ograniczenie jego zakresu.

Opis rysunków (Fig):

Fig.1. ilustruje efekt cytotsyczny 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat T.

Fig.2. ilustruje mechanizm działania apoptotycznego 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat poprzez aktywację kaspaży.

Synteza i charakterystyka pochodnych czterobromobenzoimidazolu (TBI):

Wszystkie odczynnik i rozpuszczalniki użyte do syntezy nabyto w Sigma-Aldrich. Temperatury topnienia (nie korygowane) były mierzone w otwartych rurkach kapilarnych w aparacie do pomiaru temperatury topnienia Gallenkamp-5. Widma absorpcji w ultrafiolecie rejestrowano w spektrometrze Kontron Uvikon 940. Widma  $^1\text{H}$  NMR (w ppm) były mierzone przy użyciu spektrofotometrów Varian Gemini 200 MHz i Varian UNITY plus w 298 $^\circ\text{K}$  w D6 (DMSO). Jako standard wewnętrzny stosowano czterometylosilan. Chromatografię kolumnową przeprowadzono na żelu krzemionkowym (Merck) (rozmiary ziarna 230-400). Analityczna chromatografia cienkowarstwowa (TLC) była przeprowadzona na płytach pokrytych żellem krzemionkowym F<sub>254</sub> (Merck) (grubość 0,25 mm).

Przykład I. 2-Metyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol.

Mieszankę 2-chloro-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (0.94 g, 2 mmole) i metyloaminy (30% roztwór w etanolu, 35 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszankę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 630 mg (68%) bezbarwnych kryształów o t.t. 283-285 °C. TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1): R<sub>f</sub> = 0.48.  $^1\text{H-NMR}$  (D<sub>6</sub>(DMSO)): 2.94 (d, CH<sub>3</sub>), 6.69 (q, NH), 11.60 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (462.77): C, 20.76; H, 1.09; N, 9.08. Znaleziono: C, 20.70; H, 1.25; N, 8.83.

#### Przykład II. 2-Dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszanie 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i dimetyloaminy (30% roztwór w etanolu, 30 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszanie odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 710 mg (75%) bezbarwnych kryształów o t.t. >330 °C (z rozkładem). TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1): R<sub>f</sub> = 0.48. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>(DMSO)): 3.13 (s, 2 X CH<sub>3</sub>), 11.50 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (476.79): C, 22.67; H, 1.48; N, 8.81. Znaleziono: C, 22.71; H, 1.61; N, 8.68.

#### Przykład III. 2-Etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszanie 2-metylolio-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (0.96 g, 2 mmole) i etanoloaminy (10 ml) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w łaźni olejowej o temperaturze 120 °C przez 8 godzin. Mieszanie odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 610 mg (62%) bezbarwnych kryształów o t.t. 216-218 °C. TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95:5): R<sub>f</sub> = 0.48. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>(DMSO)): 1.05 (t, CH<sub>2</sub>), 4.36 (t, CH<sub>2</sub>), 4.90 (bs, OH), 6.68 (t, NH), 11.50 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O (492.79): C, 21.94; H, 1.43; N, 8.53. Znaleziono: C, 21.90; H, 1.60; N, 8.40.

#### Przykład IV. 2-Izopropyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszanie 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i izopropyloaminy (20% roztwór w etanolu, 25 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszanie odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 690 mg (70%) bezbarwnych kryształów o t.t. 288-290 °C (z rozkładem). TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1): R<sub>f</sub> = 0.74. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>(DMSO)): 1.22 (d, 2 X CH<sub>3</sub>), 4.05 (m, CH), 6.60 (d, NH), 11.20 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (490.82): C, 24.47; H, 1.85; N, 8.56. Znaleziono: C, 24.36; H, 1.98; N, 8.40.

#### Przykład V. 2-(2-Hydroksypropylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszanie 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i 2-hydroksypropylaminy (10% roztwór wodny, 25 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszanie odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 620 mg (61%) bezbarwnych kryształów o t.t. XXXX °C. TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90:10): R<sub>f</sub> = 0.45. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>(DMSO)): 1.12 (d, CH<sub>3</sub>), 3.30 (m, CH<sub>2</sub>), 3.83 (m, CH), 4.96 (d, OH), 6.62 (t, NH), 11.40 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O (506.82): C, 23.70; H, 1.79; N, 8.29. Znaleziono: C, 23.66; H, 1.88; N, 8.16.

Przykład VI. 2-(2-Dimetyloaminoethylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszanię 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i dimetyloaminoetylaminę (10% roztwór etanolowy, 25 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszanię odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 580 mg (56%) bezbarwnych kryształów o t.t. >250 °C (z rozkładem). TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 70:30): R<sub>f</sub> = 0.15. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>6</sub>(DMSO)): 2.29 (s, 2 X CH<sub>3</sub>), 2.54 (m, CH<sub>2</sub>), 3.43 (q, CH<sub>2</sub>), 6.82 (t, NH), 11.10 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>4</sub> (519.86): C, 25.41; H, 2.33; N, 10.78. Znaleziono: C, 25.56; H, 2.48; N, 10.64.

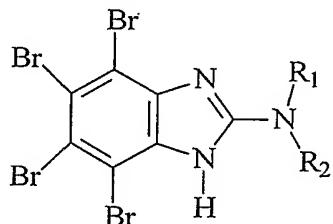
Przykład VII. Chlorowodorek 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolu.

2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (0,48 g, 1mmol) rozpuszczono na gorąco w etanolu (80 ml). Dodano kwas solny (36% roztwór wodny, 5 ml.). Prawie natychmiast z mieszanki wypada drobnokrystaliczny osad. Mieszanię oziębiono otrzymując 350 mg (68%) chlorowodorek w postaci drobnych igieł o. tt>330 °C (z rozkładem).

Z. KIEWLICZ  
M. Sc. Z. Kiewlicz  
Patolog patentowy

## Zastrzeżenia patentowe

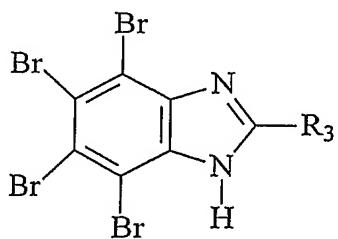
## 1. Nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1



wzór 1

w którym R<sub>1</sub> oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R<sub>2</sub> oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa.

2. Nowa pochodna wg zastrz.1, będąca 2-metyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
3. Nowa pochodna wg zastrz.1, będąca 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
4. Nowa pochodna wg zastrz.1, będąca 2-etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
5. Nowa pochodna wg zastrz.1, będąca 2-izopropyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
6. Nowa pochodna wg zastrz.1, będąca 2-(2-hydroksypropoxyamino)-4,5,6,7-tetrabromo -1H-benzimidazolem.
7. Nowa pochodna wg zastrz.1, będąca 2-(2-dimetyloaminoethylamino)-4,5,6,7-tetrabromo -1H-benzimidazolem.
8. Sposób otrzymywania nowych pochodnych 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1, w którym R<sub>1</sub> oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R<sub>2</sub> oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa, w reakcji związku o wzorze 2,



wzór 2

w którym podstawnik R<sub>3</sub> oznacza atom fluorowca, grupę alkilotiolową lub alkoksylową lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu, z aminą, w podwyższonej temperaturze, a następnie otrzymany produkt poddaje się oczyszczaniu przez krystalizację lub chromatografię na żelu krzemionkowym, po czym ewentualnie działaniem kwasu nieorganicznego lub organicznego przeprowadza się w sól.

- 9.Sposób według zastrz.8 znamienny tym, że w związku o wzorze 2 podstawnik R<sub>3</sub> oznacza atom fluorowca taki jak Cl lub Br lub grupę alkilotiolową taką jak CH<sub>3</sub>S, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>S, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>S lub niższy alkoksyl, taki jak grupa CH<sub>3</sub>O, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu, taką jak grupa sulfonowa lub grupa alkilosulfotlenkowa.
- 10.Sposób według zastrz.8 znamienny tym, że jako amina stosowana jest niższa alifatyczna amina pierwszorzędowa.
- 11.Sposób według zastrz.10 znamienny tym, że amina alifatyczna pierwszorzędowa zawiera w łańcuchu alifatycznym dodatkowo grupy hydroksylowe lub podstawione grupy aminowe.
- 12.Sposób według zastrz.8 znamienny tym, że jako amina używana jest niższa alifatyczna amina drugorzędowa.
- 13.Sposób według zastrz.8 znamienny tym, że amina jest stosowana jest jako reagent i rozpuszczalnik, w roztworze wodnym lub alkoholowym.
- 14.Sposób według zastrz.8 znamienny tym, że reakcję związku o wzorze 2 z aminą prowadzi się w zakresie temperatur od 80 do 140 °C.
- 15.Kompozycja farmaceutyczna o działaniu przeciwnowotworowym, zawierająca efektywnie, przeciwnowotworowo działającą ilość związku wg zastrz.1, w kombinacji z co najmniej jednym obojętnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem.
- 16.Kompozycja farmaceutyczna o działaniu przeciwnowotworowym, zawierająca efektywnie, przeciwnowotworowo działającą ilość związku wg któregokolwiek z zastrz.2-7, w kombinacji z co najmniej jednym obojętnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem.
- 17.Zastosowanie nowych pochodnych wg zastrz.1, do wytwarzania leku o działaniu przeciwnowotworowym.
- 18.Zastosowanie nowych pochodnych wg któregokolwiek z zastrz. 2-7, do wytwarzania leku o działaniu przeciwnowotworowym.
- 19.Sposób hamowania aktywności kinezy kazeinowej 2 u pacjentów wymagających takiego leczenia przez podawanie skutecznej ilości związku o wzorze 1 według zastrz.1.
- 20.Sposób hamowania aktywności kinezy kazeinowej 2 u pacjentów wymagających takiego leczenia przez podawanie skutecznej ilości związku wg któregokolwiek z zastrz.2-7.

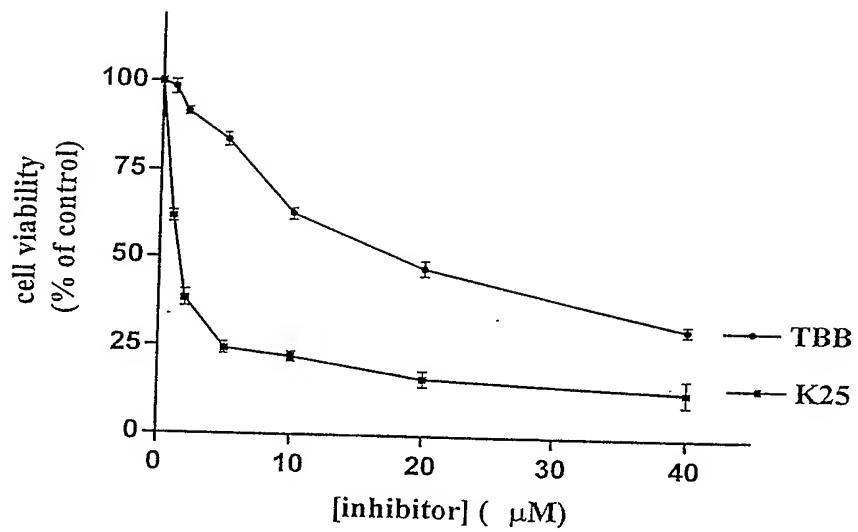


Fig. 1.

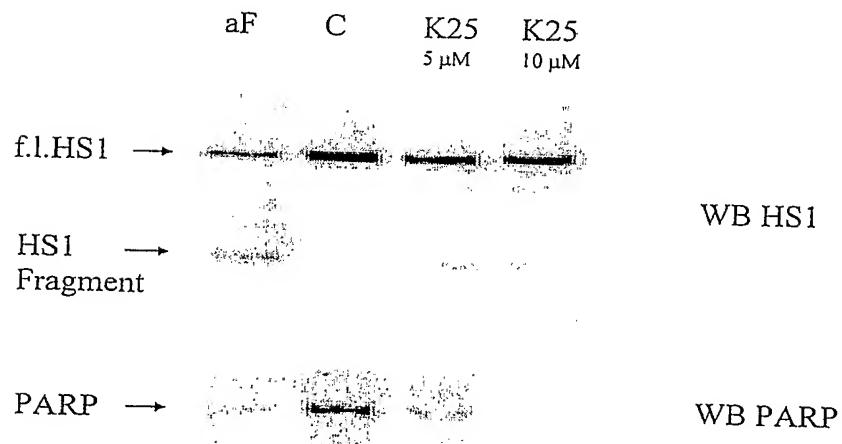


Fig.2.

P E L I N D M O C N i a z  
 mgr Z. Krewlicz  
 rzecznik patentowy